昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，June 2004，47(3)：298 – 304　　ISSN 0454-6296

腰带长体茧蜂寄生对亚洲玉米螟幼虫体内酚氧化酶活性的影响

冯从经，邱鸿贵，邱中良，符文俊*

（中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所，上海　200025）

摘要：通过对被腰带长体茧蜂 *Macrocentrus cingulum* Brischke 寄生的 5 龄亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* Guenée 幼虫体内不同组织中酚氧化酶活性的测定，采用体外注射腰带长体茧蜂雌性成蜂的萼液成分、毒液成分、萼液与毒液混合物的方法，研究了寄生蜂各种主要生理因子对寄主血清中酚氧化酶活性的影响。结果表明：寄生蜂寄生可明显抑制寄主体内的酚氧化酶活性，减少黑色素产生；被寄生组 FITC 标记的血细胞阳性百分率低于未被寄生组，差异极显著（$P < 0.01$）；萼液成分可明显地抑制亚洲玉米螟幼虫血清中酚氧化酶的活性（$P < 0.01$）；萼液与毒液混合物对酚氧化酶活性也有明显抑制作用（$P < 0.01$）。研究认为寄生蜂产卵时注入的萼液、毒液可对寄主昆虫酚氧化酶活性产生明显的抑制作用，其中萼液是抑制寄主免疫能力的主要因素。

关键词：腰带长体茧蜂；亚洲玉米螟；寄生；萼液；酚氧化酶

中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2004)03-0298-07

Effects of parasitism by *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae) on the activity of phenoloxidase in larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae)

FENG Cong-Jing, QIU Hong-Gui, QIU Zhong-Liang, FU Wen-Jun* (Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200025, China)

Abstract: The activity of phenoloxidase in various tissues of *Ostrinia furnacalis* Guenée fifth-instar larvae parasitized by *Macrocentrus cingulum* Brischke was investigated. The effects of various physiological factors on the activity of phenoloxidase and melaninization in the hemolymph of *O. furnacalis* larvae were examined by the injection of calyx fluid, venom, the mixture of calyx fluid plus venom of *M. cingulum in vitro*. The results showed that the activity of phenoloxidase in hemolymph of *O. furnacalis* was inhibited significantly by parasitism and the injection of calyx fluid or the mixture of calyx fluid plus venom of *M. cingulum* ($P < 0.01$), and the production of melanin was also reduced. The percentage of positive FITC-labelled hemocytes of the parasitized host larvae was lower than that of unparasitized larvae ($P < 0.01$). It was concluded that the melaninization could be inhibited by the injected the calyx fluid, venom or other components produced by the parasitic wasp along with laying eggs, in which calyx fluid was probably the main factor inhibiting the ability of immunity of host insect.

Key words: *Macrocentrus cingulum*; *Ostrinia furnacalis*; parasitism; calyx fluid; phenoloxidase

昆虫免疫反应包括体液免疫和细胞免疫。昆虫防御外源入侵物主要依赖自身免疫反应，依赖包括酚氧化酶原激活系统在内的昆虫免疫防御体系。酚氧化酶（phenoloxidase，PO）是昆虫体液免疫的重要组成部分，它通常以酚氧化酶原（prophenoloxidase，PPO）形式存在，酚氧化酶原级联反应被引发后产生黑色素及粘附蛋白，可以覆盖在外源物表面，有助于血细胞对细菌等外源物的吞噬作用。国内外研究集中在酚氧化酶激活系统及相关因子（Perazzolo and Barracco，1997）、酚氧化酶原激活酶（Chosa *et al*.，1997）、血细胞与酚氧化酶系统的相互作用（Da Silva *et al*.，2000）及酚氧化酶级联反应系统在血淋巴凝

基金项目：国家自然科学基金重点项目(39930030)

作者简介：冯从经，男，1974 年 10 月生，昆虫生理生化博士，E-mail：fengcj1@hotmail.com

* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：fuwenjun@public6.sta.net.cn

收稿日期 Received：2003-07-23；接受日期 Accepted：2003-11-20

集中的作用（Li *et al.*, 2002）等。但有关寄生蜂生理因子对酚氧化酶活性的影响报道较少。目前，酚氧化酶原级联反应的功能及其分子机制还不清楚，在包囊作用、结节形成、吞噬作用和细胞毒性及酚氧化酶原产生等过程中是否不同类型的血细胞都参与了各种防御过程也有疑问。本研究对多胚发育的腰带长体茧蜂 *Macrocentrus cingulum* Brischke 和亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* Guenée 寄生体系中酚氧化酶活性及作用展开研究，旨在了解寄生蜂寄生过程中对寄主内部调控的生理机制，特别是可能影响寄主发育和免疫的诸多寄生因子与酚氧化酶间的关系。

1　材料和方法

1.1　供试昆虫

亚洲玉米螟幼虫在室内(25±1)℃，相对湿度＞90%，14L∶10D 光周期条件下，依周大荣等（1980）方法采用半人工饲料饲养，根据其头壳宽度来鉴别其龄期。

1.2　腰带长体茧蜂对亚洲玉米螟幼虫的寄生

将羽化 3 日龄的腰带长体茧蜂雌蜂与 4 龄亚洲玉米螟幼虫按 3∶1 的比例放入玻璃瓶内，以少量新鲜幼嫩玉米茎饲养亚洲玉米螟幼虫，腰带长体茧蜂成蜂以 10%蜂蜜糖水喂养，在腰带长体茧蜂寄生亚洲玉米螟幼虫 6～8 h 后，将被寄生的亚洲玉米螟幼虫取出，放入人工饲料中，饲养至实验虫态。

1.3　毒液和萼液的提取

在 Olympus ULWD 解剖镜下用镊子将未产卵的雌蜂产卵器拉出，将整个腹部置于预冷的昆虫 Ringer 生理盐水（NaCl 0.65 g，KCl 0.025 g，$CaCl_2$ 0.03 g，配成 100 mL，加入 0.025 g $NaHCO_3$，pH 6.8）中，然后将毒腺及毒液贮器和卵巢分离开，将侧输卵管与卵巢小管相接处卵巢萼区，再分别移入不同的含有生理盐水的 Eppendorf 管中，用镊子轻轻划破薄壁的毒液贮器组织及卵巢萼区组织，分别让其在生理盐水中缓慢释放 5 min，12 000×g 离心 5 min，取上清液调整到所需雌蜂当量浓度（雌蜂数/μL），立即置于低温冰箱 −80℃保存。

1.4　毒液、萼液及毒液与萼液混合物的注射

分别取 0.1 及 0.3 雌蜂当量（FE/μL）的毒液、萼液及毒液与萼液混合物 1 μL 注入用冰麻醉的刚进入 5 龄的亚洲玉米螟幼虫腹足内，不封闭伤口部位，对照组注入 1 μL 生理盐水，处理后昆虫放在洁净指形管内。

1.5　血淋巴的体外黑化反应观察

参照 Doucet 和 Cusson（1996）方法，将未稀释的亚洲玉米螟幼虫血淋巴滴在 Parafilm 膜上，在室温下放置 20 min，观察血淋巴颜色的变化，当颜色由淡乳白色变为黑褐色则记为正常黑化；而仍保持原来颜色的则记为黑化反应被抑制，计算发生黑化反应虫数所占的百分率。

1.6　血清及血细胞溶离物制备

取不同日龄、时龄的未被寄生、被寄生、注射生理盐水、注射毒液、注射萼液及注射毒液与萼液混和物的 5 龄亚洲玉米螟幼虫，每组 30 头，剪破腹足将流出的血淋巴转移到含有 0.5 mL 的二甲胂酸钠（CAC）缓冲液（10 mmol/L 二甲胂酸钠，20 mmol/L 氯化钙，pH 6.5）的 Eppendorf 管中，稀释后的血淋巴在 4℃下 800×g 离心 10 min，转移上清液作为血清置于 −80℃低温冰箱保存，分析前融冻。将血细胞沉淀用 CAC 缓冲液洗两次，4℃下 800×g 离心 10 min，在细胞沉淀中加入 500 μL CAC 缓冲液，冰浴下玻璃匀浆器匀浆后超声波发生器间歇破碎 10 min，匀浆液 4℃下 10 000×g 离心 10 min，上清液作为血细胞溶离物置于 −80℃低温冰箱备用。

1.7　体壁组织提取液的制备

取不同日龄、时龄的未被寄生及被寄生的 5 龄亚洲玉米螟幼虫，每组 30 头，将剪下的亚洲玉米螟幼虫第 3 至第 6 腹节的体壁组织轻轻转移到滤纸上，吸去水分，加入 500 μL CAC 缓冲液，冰浴匀浆后超声波发生器间歇破碎 10 min，4℃下 10 000×g 离心 10 min，取上清液置于 −80℃低温冰箱保存，分析前融冻。

1.8　蛋白质浓度测定

血清、血细胞溶离物及体壁组织提取液中蛋白质浓度的测定采用 Bradford（1976）方法。

1.9　酚氧化酶活性的测定

参照 Jiang 等（1997）方法，酚氧化酶活性以 L-DOPA 转化成多巴色素时 490 nm 处的吸光值表示。测定时取不同处理组的血清、血细胞溶离物及体壁组织提取液 50 μL 分别作为粗酶液，再加入 40 μL 0.1 mol/L 氯代十六烷基吡啶（CPC）于比色杯中混匀，30℃下温育 10 min，然后加入 50 μL 0.02 mol/L L-DOPA 作为底物继续温育 1 min，加入 CAC 缓冲液至总体积 3.0 mL，测定 490 nm 处 1 min 内吸光值的增大值。每毫克蛋白吸光值增大 0.001 设定为 1 个酶单位，重复 6 次，计算酚氧化酶活性。

1.10 血细胞的检测方法

用间接免疫荧光(indirect immunofluorescence assay, IIFA)拍照检测及荧光激活细胞分选仪(fluorescence-activated cell sorter, FACS)对血细胞进行检测。

将不同日龄的被寄生和未被寄生的5龄亚洲玉米螟幼虫放血,然后将血细胞 800×g 离心 10 min,血细胞沉淀中加入 600 μL 固定剂室温下放置 10 min,4℃下 800×g 离心 10 min,收集血细胞,用 MC-saline(用重蒸水配制 6 mmol/L NaCl,15 mmol/L KCl,144 mmol/L 蔗糖,0.1% PVP,5 mmol/L K_2HPO_4/KH_2PO_4,5 mmol/L $CaCl_2$,5 mmol/L $MgSO_4$)洗3次,加入含3%牛血清白蛋白(BSA)的 MC-saline,4℃下封阻过夜,加入1:1 000的兔抗烟草天蛾酚氧化酶原的抗血清,在37℃的恒温箱中放置1 h,再用 MC-saline 洗3次,加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔 IgG,4℃下温浴6 h,800×g 离心 10 min,用 MC-saline 洗3次,再悬浮于0.3 mL MC-saline中,以不加一抗的血细胞为阴性对照。同一批次样品分别用于间接免疫荧光拍照检测和在细胞仪(FACStar Plus型流式,美国 Becton Dickinson 公司产品)上检测,激光工作条件:氩离子激光器为 Innova 90-5型,激光功率为 200 mW,激光波长为 488 nm,使用 Becton Dickinson 公司 Lysis 和 CELLQUEST 处理软件。

1.11 数据处理

数据采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析、*t* 测验和 Duncan 多重比较等统计分析,所用数据为平均数±标准差(mean±*SD*)。

2 结果与分析

2.1 腰带长体茧蜂寄生对亚洲玉米螟幼虫血淋巴黑化现象的影响

从图1可知,亚洲玉米螟5龄幼虫未被寄生组幼虫血淋巴黑化百分率为100%,表明未被寄生幼虫黑化作用产生不受影响。同未被寄生组相比,被寄生组血淋巴的黑化百分率明显下降,差异极显著($P<0.01$),且随寄主幼虫日龄增加呈明显下降趋势。结果表明,寄生蜂寄生可以明显抑制寄主幼虫血淋巴黑色素的产生,避免黑色素在寄生蜂卵及幼虫表面大量沉积,从而使寄生物在寄主体内成功寄生。

2.2 腰带长体茧蜂寄生对亚洲玉米螟幼虫体内不同组织中酚氧化酶活性的影响

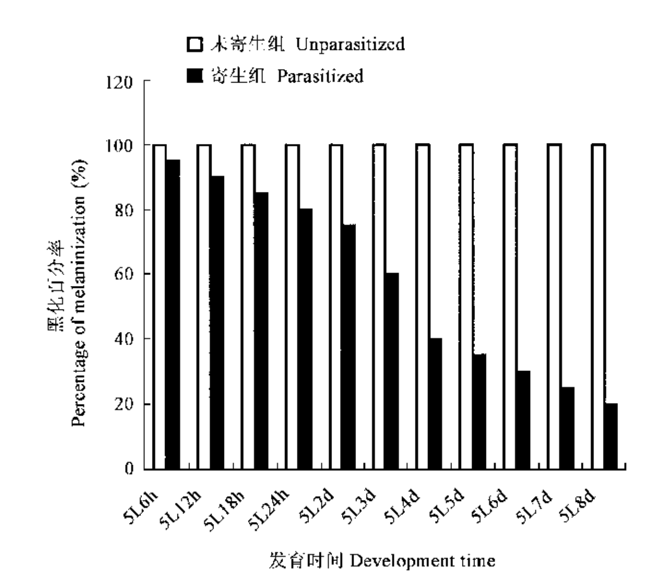


图1 腰带长体茧蜂寄生对亚洲玉米螟5龄幼虫血淋巴黑化现象的影响

Fig. 1 Influence of parasitism by *M. cingulum* on the hemolymph melaninization of *O. furnacalis* 5th instar larvae

5L6h: 5龄第6小时 6th hour of 5th-instar; 5L2d: 5龄第2日 2nd day of 5th-instar; 其余类推 The others are by analogy. 下同 the same below.

为了搞清寄主被寄生后其血淋巴黑化百分率的下降是否因酚氧化酶活性受抑制而引起,我们测定了被腰带长体茧蜂寄生的亚洲玉米螟幼虫体内不同组织中的酚氧化酶活性,结果表明被寄生的寄主幼虫体内的酚氧化酶活性显著低于未被寄生组寄主幼虫($P<0.01$)。在未被寄生的5龄幼虫血清中,5龄第6小时到5龄第3日酚氧化酶活性呈下降趋势,此后又渐趋上升。被寄生组5龄幼虫血清中酚氧化酶活性在被寄生后6~24 h内迅速下降,在5龄第3日(5L3d)至5龄第6日(5L6d)下降趋势变缓。

由表1可知被寄生组幼虫体壁组织中酚氧化酶活性明显低于未被寄生组($P<0.01$),说明寄生也对体壁组织中酚氧化酶活性产生了抑制作用,不同日龄寄主幼虫体壁组织中酚氧化酶活性变化规律同血清中酚氧化酶类似。被寄生5龄幼虫血细胞溶离物内酚氧化酶活性同未被寄生组幼虫比酚氧化酶活性显著降低($P<0.01$)。不同组织中酚氧化酶活性差异明显($P<0.01$),其中以血清最高,体壁组织次之,血细胞溶离物最低,表明酚氧化酶主要存在于血清中。

2.3 寄生对寄主血细胞中酚氧化酶原的影响

由表2可知,经 FACS 检测被寄生组 FITC 标记的血细胞阳性百分率低于未被寄生组,差异极显著

表 1　腰带长体茧蜂寄生后亚洲玉米螟 5 龄幼虫不同组织中酚氧化酶活性（mean ± *SD*，*n* = 6）

Table 1　The activity of phenoloxidase in various tissues in 5th instar larvae of *O. furnacalis* parasitized by *M. cingulum*

	血清 Hemolymph		体壁 Integument		血细胞溶离物 Hemocyte lysate	
	未被寄生 Unparasitized	被寄生 Parasitized	未被寄生 Unparasitized	被寄生 Parasitized	未被寄生 Unparasitized	被寄生 Parasitized
5L6h	34.5 ± 3.0 E	28.1 ± 2.1 G	27.7 ± 0.9 E	17.5 ± 1.2 G	25.2 ± 1.6 F	20.0 ± 1.5 F
5L12h	29.9 ± 4.2 ED	17.3 ± 1.4 F	23.3 ± 1.4 D	11.4 ± 1.3 F	22.7 ± 0.8 E	11.1 ± 1.1 E
5L18h	28.0 ± 3.1 BC	15.1 ± 1.2 E	19.7 ± 2.9 BC	8.2 ± 0.9 E	18.3 ± 1.1 D	8.2 ± 0.6 D
5L24h	22.4 ± 3.4 B	14.1 ± 2.2 DE	13.1 ± 1.5 A	8.3 ± 0.7 E	14.0 ± 1.2 C	8.1 ± 0.5 D
5L2d	18.2 ± 3.1 A	12.7 ± 1.3 D	10.6 ± 1.6 A	6.8 ± 1.0 C	8.5 ± 0.4 A	7.3 ± 0.6 CD
5L3d	17.2 ± 1.6 A	10.9 ± 1.2 C	11.2 ± 1.6 A	5.3 ± 0.7 B	9.4 ± 1.8 AB	6.5 ± 1.1 C
5L4d	30.4 ± 2.3 CD	10.2 ± 1.2 C	17.5 ± 1.6 B	4.4 ± 0.6 B	10.2 ± 1.1 AB	4.4 ± 0.4 B
5L5d	33.3 ± 2.7 D E	8.4 ± 0.8 B	20.3 ± 1.9 C	4.5 ± 0.6 B	10.5 ± 0.8 B	3.4 ± 0.6 A
5L6d	38.5 ± 4.0 F	5.2 ± 0.7 A	24.7 ± 3.4 D	3.0 ± 0.3 A	14.3 ± 2.7 C	3.7 ± 0.2 A

注：同一列中字母不相同者，差异显著（$P < 0.01$）。

Note: Means followed by different letter within a column are significantly different（$P < 0.01$）.

表 2　用 FITC 标记亚洲玉米螟 5 龄幼虫血细胞后 FACS 检测的阳性百分率（%）

Table 2　The positive rate of hemocytes labelled by FITC in *O. furnacalis* 5th instar larvae detected by FACS

	对照 Control	第 12 小时 12th h	第 2 天 2nd day	第 4 天 4th day	第 6 天 6th day
未被寄生 Unparasitized	2.85	33.20	81.54	85.06	90.73
被寄生 Parasitized	2.85	13.91	11.35	3.67	6.63

（$P < 0.01$），说明寄生蜂寄生可对寄主血细胞产生酚氧化酶原的能力有十分明显的抑制作用，未被寄生组 FITC 标记的血细胞阳性百分率随寄主发育时间的延长而明显上升，说明随虫体正常发育，其产生酚氧化酶原的能力在不断增强。就被寄生组而言，FITC 标记的血细胞阳性百分率随寄生后时间的延长总体呈下降趋势，此结果也进一步证明寄生蜂产卵时注入的诸多生理因子可对寄生血细胞中酚氧化酶原的产生有抑制作用，这种抑制作用一直维持到寄生后第 6 天，而且随着寄生时间延长而抑制作用增强。

IIFA 结果（图 2）表明，酚氧化酶原主要由类绛色细胞和粒细胞两类细胞产生，类绛色细胞的荧光强度明显比粒细胞强，但粒细胞在被标记的细胞中占绝对多数。

2.4　注射毒液对亚洲玉米螟 5 龄幼虫血清中酚氧化酶活性的影响

对亚洲玉米螟 5 龄幼虫分别注射生理盐水、0.1 雌蜂当量和 0.3 雌蜂当量的毒液后，注射生理盐水组幼虫血清中酚氧化酶活性明显高于未被注射组（$P < 0.01$）（图 3：A），说明注射的生理盐水可以诱导酚氧化酶活性的上升。0.1 雌蜂当量毒液注射组的酚氧化酶活性较未被注射组低，说明注射的毒液中含有能抑制酚氧化酶活性的成分。但注射 0.3 雌蜂当量的毒液组与注射 0.1 雌蜂当量的毒液组对酚氧化酶活性的抑制作用没有明显区别（$P > 0.05$），另外，在毒液中未检测到酚氧化酶活性。

2.5　注射萼液对亚洲玉米螟 5 龄幼虫血清中酚氧化酶活性的影响

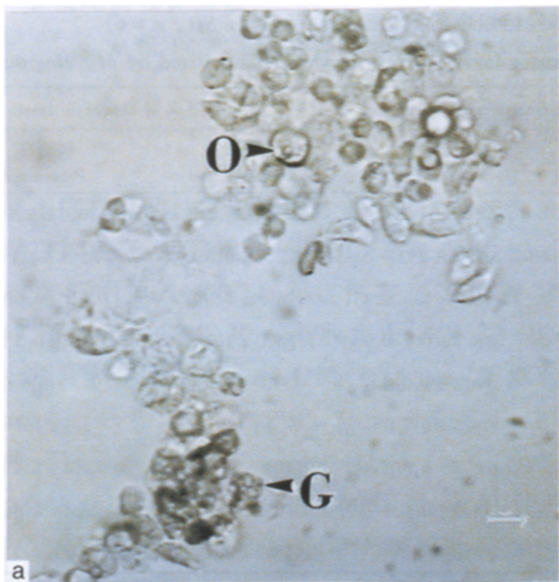
从图 3（B）可以看出，注射 0.1 雌蜂当量和 0.3 雌蜂当量萼液的寄主幼虫的血清中酚氧化酶的活性明显低于未注射组（$P < 0.01$），说明萼液对酚氧化酶的活性产生明显的抑制作用。随着注入萼液量的增加，对酚氧化酶活性的抑制作用明显增强（$P < 0.01$）。

2.6　注射毒液与萼液混合物对亚洲玉米螟 5 龄幼虫血清中酚氧化酶活性的影响

将萼液与毒液混合物注入亚洲玉米螟 5 龄幼虫后，注射组酚氧化酶的活性明显低于未被注射组（$P < 0.01$），注射 0.3 雌蜂当量组的酚氧化酶活性又低于注射 0.1 雌蜂当量组（$P < 0.01$）（图 3：C）。

3　讨论

寄生蜂雌蜂产卵于寄主体内同时注入分泌物，使寄主的行为、发育、生理生化都发生了改变，以产生适合寄生蜂幼虫早期生长的环境。寄主幼虫被寄



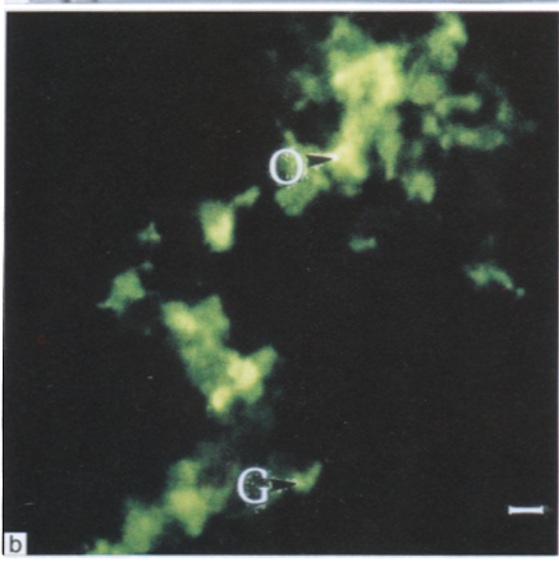


图 2 亚洲玉米螟 5 龄幼虫不同类型血细胞的酚氧化酶原免疫荧光定位

Fig. 2 The localization of immunofluorescence of prophenoloxidase in different hemocytes of *O. furnacalis* 5th instar larvae

a. 光学显微镜图 Light microscopical image; b. 荧光显微镜图 Fluorescent microscopical image; 刻度尺 Scale bars = 15 μm. O: 类绛色细胞 Oenocytoid; G: 粒细胞 Granular hemocyte. 第一抗体为兔抗烟草天蛾酚氧化酶原抗血清，第二抗体为异硫氰酸荧光素标记的羊抗兔 IgG The first antibody is antiserum of rabbit anti-*Manduca sexta* prophenoloxidase and the second antibody is fluorescein isothiocyante (FITC)-labelled goat anti-rabbit IgG.

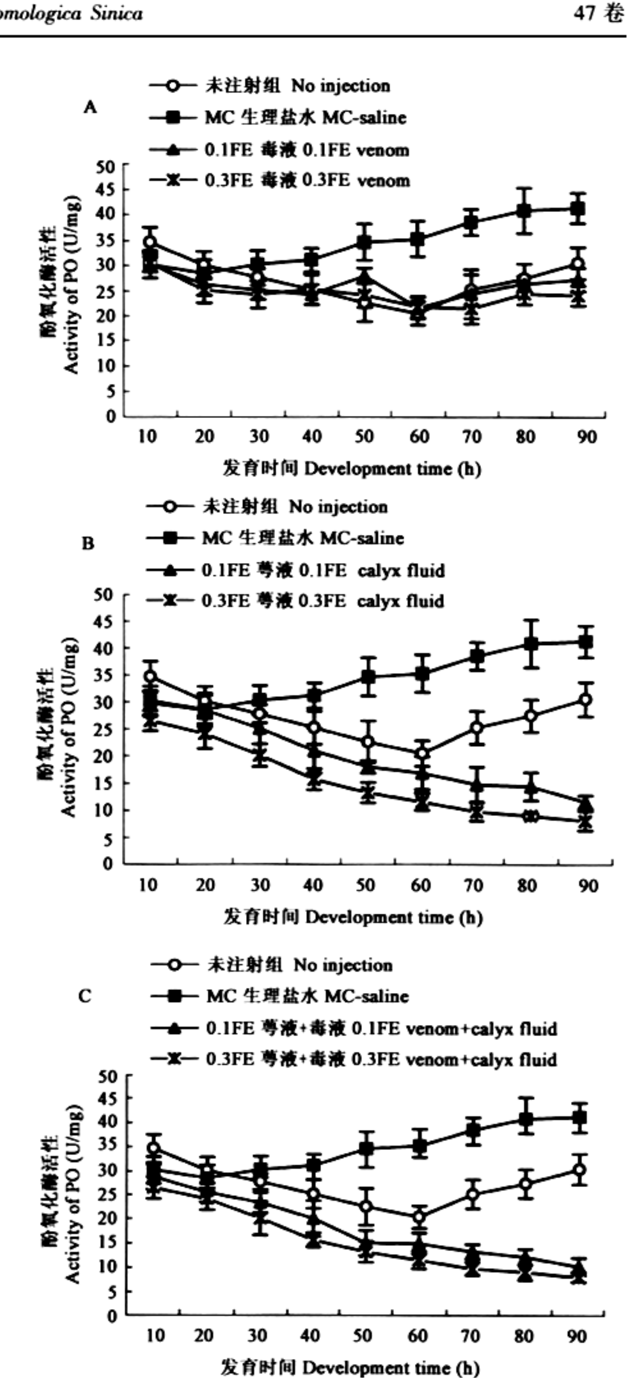


图 3 注射毒液(A)、萼液(B)及萼液与毒液混合物(C)对亚洲玉米螟 5 龄幼虫血清中酚氧化酶活性的影响

Fig. 3 Influence of venom (A), calyx fluid (B) and the mixture of calyx fluid plus venom(C) injection on the activity of phenoloxidase in hemolymph of *O. furnacalis* 5th instar larvae

生后，血淋巴的一些性状发生了改变，其中主要的变化包括血淋巴的粘性降低 (Strand and Noda, 1991)，酚氧化酶的活性受到了抑制以及新的多肽的出现 (Beckage and Kanost, 1993)。我们的实验结果显示腰带长体茧蜂寄生可以明显抑制亚洲玉米螟幼虫血淋巴中黑色素的产生，从而使寄生蜂幼虫得以逃避寄主的黑化包囊反应。寄主被寄生后黑色素含量下降可能有三方面原因：一是由于寄生使寄主体内部分组织中酚氧化酶活性下降导致黑色素产生减少；二是因为寄生蜂寄生引起寄主幼虫的应激反应，从

而产生更多的活性氧自由基（reactive oxygen species），抑制了黑色素前体物醌的形成；三是可能由于缺少酚氧化酶原的激活或血淋巴中缺少适当的底物，寄生可能引起了丝氨酸蛋白酶抑制剂同蛋白酶激活剂上丝氨酸残基结合而阻碍了酚氧化酶原的级联反应，导致酚氧化酶活性受抑制，最终可造成寄主体壁硬化和鞣化过程受阻。本实验证实被寄生的亚洲玉米螟幼虫血清、体壁组织和血细胞溶离物中酚氧化酶活性都低于未被寄生组（表 1），说明寄生导致酚氧化酶活性下降至少是寄主黑化能力降低的原因之一。Stoltz 和 Cook（1983）报道烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 幼虫在被美洲棉铃虫齿唇姬蜂 *Campoletis sonorensis* 寄生 9～12 h 后，暴露在空气中的血淋巴胞质黑化减弱或消失，他们也认为这种现象是由于酚氧化酶活性降低引起的。

在我们的实验体系中，腰带长体茧蜂是多胚发育的寄生蜂，体内未发现多分 DNA 病毒（polydnavirus，PDV），是一个特殊的寄生体系。通常腰带长体茧蜂在产卵的同时将一些分泌物注入寄主体内，诸如毒液、萼液和卵巢蛋白。当腰带长体茧蜂的毒液以 0.1 雌蜂当量注入亚洲玉米螟幼虫体内后酚氧化酶的活性受到抑制，而注射量增加到 0.3 雌蜂当量时，这种抑制作用无明显差异（图 3：A）。这一结果说明毒液可能参与酚氧化酶活性的调节，但并非调控酚氧化酶活性的主要生理因子。在其他寄生蜂/寄主体系中也有报道认为毒液不能抑制酚氧化酶活性，例如 Richards 和 Edwards（2000）研究发现正常的和注入外寄生蜂 *Eulophus pennicornis* 毒液的 5 龄 *Lacanobia oleracea* 幼虫血淋巴在体外都会迅速黑化，而被 *E. pennicornis* 寄生的 5 龄番茄夜蛾幼虫血淋巴的黑化程度较低且速度较慢，在被寄生 5 天后的番茄夜蛾幼虫的血细胞溶离物和血清中酚氧化酶活性明显低于未处理组和注射毒液组，认为 *E. pennicornis* 的寄生抑制了番茄夜蛾幼虫血淋巴中酚氧化酶活性，但这不是由寄生蜂成蜂的毒液引起的。Parkinson 等（2001）首次发现在寄生蜂 *Pimpla hypochondriaca* 的毒液中有酚氧化酶活性，认为酚氧化酶是毒液的组成部分，他们从毒腺的 cDNA 文库中分离到 3 个基因，其编码产物与酚氧化酶原有关，并命名为酚氧化酶Ⅰ、酚氧化酶Ⅱ和酚氧化酶Ⅲ。Dani 等（2003）研究发现内寄生蜂 *Pimpla hypochondriaca* 的毒液是由高分子量和低分子量的蛋白组成的混和物，具有酚氧化酶活性和免疫抑制特性，能引起寄主昆虫的麻痹。Asgari 等（2003）从内寄生蜂 *Cotesia rubecula* 的毒液中分离到与丝氨酸蛋白酶类似物（serine protein homologs）同源的毒液蛋白，并将其注入寄主菜粉蝶 *Pieris rapae* 体内，也发现抑制了寄主血淋巴的黑化。说明不同寄生体系中毒液的组成和作用也有差异，需进一步深入研究。值得注意的是，本研究表明注射生理盐水的对照中寄主的酚氧化酶活性明显升高，Doucet 和 Cusson（1996）也发现在 *Tranosema rostrale* 和枞色卷蛾 *Choristoneura fumiferana* 寄生体系中，将生理盐水注入枞色卷蛾幼虫体内引起寄主血淋巴中酚氧化酶活性上升。这一现象可能是由于注射造成幼虫表皮受伤而应激诱导酚氧化酶活性上升，另一方面也可能是生理盐水中的金属离子等有助于酚氧化酶原系统的激活，从而使酚氧化酶活性上升。

从本研究结果比较，腰带长体茧蜂萼液对酚氧化酶活性的抑制显然优于毒液注射液，无论单独注射 0.1 雌蜂当量的萼液或萼液与毒液混和物均对亚洲玉米螟幼虫血清中酚氧化酶活性产生明显的抑制作用，而当注射量增加到 0.3 雌蜂当量时，酚氧化酶活性的抑制也进一步增强（图 3：B，C）。这些结果说明腰带长体茧蜂萼液可能是调节寄主酚氧化酶活性的重要生理因子。Beck 等（2000）研究发现在姬蜂科内寄生蜂 *Venturia canescens* 的萼液存在丝氨酸蛋白酶抑制剂（serpin），它能够改变血细胞的散布特性和抑制寄主血淋巴的黑化。他们认为丝氨酸蛋白酶抑制剂能使寄主短暂失去防御反应能力直至寄生蜂卵表面形成其他保护途径。内寄生蜂能够在寄主体内生长发育是由于它具有克服或逃避寄主昆虫的免疫系统的能力。现在已知，姬蜂科和茧蜂科的一些内寄生蜂体内带有 PDV、毒液、萼液蛋白等，这些物质在寄生蜂成功寄生中起着重要作用。但是 PDV 仅在膜翅目少数几个亚科的寄生蜂中存在，在一些没有 PDV 的膜翅目寄生蜂中毒液和萼液蛋白可能是调节寄主免疫的主要因子（Webb，1998）。在腰带长体茧蜂雌蜂萼液中含有萼液蛋白但没有 PDV（另文发表），可以认为在本实验中寄生对亚洲玉米螟血淋巴黑化的抑制及萼液对酚氧化酶活性的抑制主要由萼液蛋白引起。但是，对腰带长体茧蜂中的萼液蛋白的性质和生理功能还有待进一步研究。

参考文献（References）

Asgari S，Zhang G，Zareie R，Schmidt O，2003. A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits activation of the host hemolymph prophenoloxidase. *Journal of Insect Biochemistry*

and Molecular Biology, 33: 1 017 - 1 024.

Beck M, Theopold U, Schmidt O, 2000. Evidence for serine protease inhibitor activity in the ovarian calyx fluid of the endoparasitoid *Venturia canescens*. *J. Insect Physiol.*, 46: 1 275 - 1 283.

Beckage NE, Kanost MR, 1993. Effects of parasitism by the braconid wasp *Cotesia congregata* on host hemolymph protein of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 23(5): 643 - 653.

Bradford M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 - 254.

Chosa N, Fukumitsu T, Fujimoto K, Ohnishi E, 1997. Activation of prophenoloxidase A1 by an activating enzyme in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(1): 61 - 68.

Da Silva C, Dunphy GB, Rau ME, 2000. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar *Acheta domesticus* with bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 24(4): 367 - 379.

Dani MP, Richards EH, Isaac RE, Edwards JP, 2003. Antibacterial and proteolytic activity in venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *J. Insect Physiol.*, 49(10): 945 - 954.

Doucet D, Cusson M, 1996. Role of calyx fluid in alterations of immunity in *Choristoneura fumiferana* larvae parasitized by *Tranosema rostrale*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 114A(4): 311 - 317.

Jiang HB, Wang Y, Korochkina SE, Benes H, Kanost MR, 1997. Molecular cloning of cDNAs for two pro-phenol oxidase subunits from the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(7): 693 - 699.

Li D, Scherfer C, Korayem AM, Zhao Z, Schmidt O, Theopold U, 2002. Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(8): 919 - 928.

Parkinson N, Smith I, Weaver R, Edwards JP, 2001. A new form of arthropod phenoloxidase is abundant in venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 57 - 63.

Perazzolo LM, Barracco MA, 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Dev. Comp. Immunol.*, 21(5): 385 - 395.

Richards EH, Edwards JP, 2000. Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitoid, *Eulophus pennicornis*, is associated with a reduction in host haemolymph phenoloxidase activity. *Comparative Biochemistry and Physiology* (*B*), 127(3): 289 - 298.

Stoltz DB, Cook DI, 1983. Inhibition of host phenoloxidase activity by parasitoid Hymenoptera. *Experimentia*, 39: 1 022 - 1 024.

Strand MR, Noda T, 1991. Alterations in the hemocytes of *Pseudoplusia includens* after parasitism by *Microplitis demolitor*. *J. Insect Physiol.*, 37(11): 839 - 850.

Webb BA, 1998. Polydnavirus biology: genome structure and evolution. In: Miller LK, Ball LA eds. The Insect Viruses. New York: Plenum Press. 105 - 139.

Zhou DR, Wang YY, Liu BL, 1980. Research on the reproduction of *Ostrinia furnacalis* in a large quantity: an artificial diet and its improvement. *Acta Phytophylacica Sinica*, 7: 113 - 122. [周大荣, 王玉英, 刘宝兰, 1980. 玉米螟人工繁殖研究 I: 一种半人工饲料及其改进. 植物保护学报, 7: 113 - 122]

(责任编辑: 黄玲巧)